

Fermented whey product prepd. using mixt. of lactic acid bacteria and yeast - for improving appearance of the skin by topical or external application, also useful as an immunostimulant

Patent Number : FR2718752

International patents classification : C12P-001/00 A23C-021/02 A61K-007/00 A61K-035/20 C12R-001:23 C12R-001:24 C12R-001:245 C12R-001:46 C12R-001:72 C12R-001:85

• Abstract :

FR2718752 A Prepn. of a whey-based prod. (A) comprises fermenting whey with a mixt. contg. 1 each of: (a) a Lactobacillus (La) of the species hilgardii, casei, cellobiosus, brevis, acidophilus, kefir and delbrueckii; (b) a Streptococcus (St) of the species lactis, cremoris and diacetylactis; (c) a Leuconostoc (Le) of the species mesenteroides and kefir, and (d) a yeast of the species Saccharomyces delbrueckii, S. cerevisiae, S. unisporus, S. globosus, S. carlsbergensis, Kluyveromyces fragilis, K. bulgaricus, K. lactis, Torula holmii, Candida tenuis and C. kefir.

Also claimed are: (1) the prod. (A) as above; (2) a drinkable cosmetic compsn. which contains (A), and (3) a cosmetic compsn. for external use which contains (A).

USE - (A) is useful in (a) cosmetic compsns. for drinking or external application, to improve the appearance of the skin or (b) in immunostimulant compsns. (claimed). (A) affects the level of sebum, and the degree of hydration and firmness of the skin, making it softer and smoother.

ADVANTAGE - (A) significantly increases the antiradical activity of agents such as vitamins or selenium. (Dwg.0/3)

• Publication data :

Patent Family : FR2718752 A1 19951020 DW1995-47 C12P-001/00 35p * AP: 1994FR-0009031 19940721
Priority n° : 1994FR-0004506 19940415
Covered countries : 1
Publications count : 1

• Patentee & Inventor(s) :

Patent assignee : (WORLD-) WORLD TRUST INVESTMENT SA
Inventor(s) : ALBRECHT P

• Accession codes :

Accession N° : 1995-360594 [47]
Related Acc. N° : 1995-360593
Sec. Acc. n° CPI : C1995-157605

• Derwent codes :

Manual code : CPI: B04-B04K B14-G01
 B14-R01 D03-B D03-B01 D03-H01 T2
 D05-A02A D05-A04 D08-B09A
Derwent Classes : B04 D13 D16 D21
Compound Numbers : R00282-M R00179-M
 R04454-M R00185-M R01780-M
 R01662-M

• Update codes :

Basic update code : 1995-47

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8
①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 718 752

②1 N° d'enregistrement national : 94 09031

⑤1 Int Cl⁸ : C 12 P 1/00, A 61 K 7/00, 35/20, A 23 C 21/02(C 12 P 1/00, C 12 R 1:23, 1:24, 1:245)(C 12 P 1/00, C 12 R 1:46, 1:85, 1:72)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 21.07.94.

③0 Priorité : 15.04.94 FR 9404506.

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 20.10.95 Bulletin 95/42.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : WORLD TRUST INVESTMENT (SA)
— LU.

⑦2 Inventeur(s) : Albrecht Pierjean.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Ores.

⑤4 Préparations à base de lactosérum fermenté et leurs utilisations.

⑤7 L'invention est relative à un procédé d'obtention d'une préparation à base de lactosérum comprenant une étape au cours de laquelle on procède à la fermentation de lactosérum par un mélange de microorganismes comprenant au moins un lactobacille choisi dans le groupe constitué par *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kéfir*, *Lactobacillus delbrueckii*; au moins un streptocoque choisi dans le groupe constitué par: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, au moins un *Leuconostoc* choisi dans le groupe constitué par: *Leuconostoc mesenteroides*, et *Leuconostoc kéfir*; au moins une levure choisie dans le groupe constitué par: *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *Saccharomyces unisporus*, *Torula holmii*, *Saccharomyces globosus*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida tenuis*, *Candida kéfir*, ainsi qu'aux préparations fermentées obtenues par ce procédé et à leurs applications immunostimulantes et cosmétiques.

FR 2 718 752 - A1



La présente Invention est relative à des préparations à base de lactosérum fermenté, utilisables pour améliorer l'état de la peau.

Des produits issus de la fermentation du lait, en particulier par des bactéries lactiques (produits du type yaourt), ou par des levures (produits du type kefir), sont connus depuis très longtemps et sont réputés avoir une action favorable sur la santé, qui est attribuée à leur effet sur l'équilibre de la flore intestinale.

Les Inventeurs ont maintenant mis au point un produit issu de la fermentation de lactosérum par un mélange de souches spécifiques de bactéries lactiques et de levures, et ont constaté que ce produit possédait une activité particulièrement bénéfique pour le tissu cutané, aussi bien par administration systémique (voie orale), que par administration locale (usage externe).

La présente Invention a pour objet un procédé d'obtention d'une préparation à base de lactosérum, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on procède à la fermentation de lactosérum par un mélange de microorganismes comprenant au moins un lactobacille choisi dans le groupe constitué par *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus delbrueckii* ; au moins un streptocoque choisi dans le groupe constitué par : *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, au moins un *Leuconostoc* choisi dans le groupe constitué par : *Leuconostoc mesenteroides*, et *Leuconostoc kefir* ; au moins une levure choisie dans le groupe constitué par : *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *Saccharomyces unisporus*, *Torula holmii*, *Saccharomyces globosus*,

Saccharomyces carlbergensis, *Kluyveromyces lactis*,
Candida tenuis, *Candida kefir*.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du
procédé conforme à l'Invention, ledit mélange de micro-
5 organismes comprend au moins : *Lactobacillus acidophilus*,
Streptococcus lactis, *Streptococcus cremoris*, *Streptococ-*
cus diacetylactis, *Leuconostoc mesenteroides*, *Kluyvero-*
myces lactis.

Le procédé conforme à l'Invention peut être
10 mis en oeuvre à partir de lactosérum frais, directement
issu de la fabrication fromagère, ou d'un lactosérum
reconstitué à partir de poudre de lactosérum. On peut
ajouter au lactosérum des substrats facilitant la crois-
sance du mélange de microorganismes, tels que par
15 exemple, des extraits de levure, de mélasses, ou
n'importe quelle autre substance connue en elle-même pour
faciliter le démarrage de la fermentation par les souches
considérées.

On effectue l'ensemencement du lactosérum par
20 un inoculat du mélange d'un microorganisme tel que défini
ci-dessus. Avantageusement, cet inoculat a préalablement
subi une préculture pendant une durée comprise entre 12
et 20 heures, par exemple 16 heures, dans un milieu
convenant à la croissance de l'ensemble desdits micro-
25 organismes, tel que par exemple, le milieu M17.

On procède de préférence à la fermentation,
sous agitation, à une température comprise entre 25 et
30°C, pendant une durée comprise entre 18 et 30 heures,
par exemple 24 heures.

Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré
30 du procédé conforme à l'Invention, il comprend en outre
une étape au cours de laquelle l'on procède à la cen-
trifugation du lactosérum fermenté, à une force centri-
fuge comprise entre 4000 et 8000 g, de préférence 4500 g
35 environ, et l'on recueille le surnageant.

Selon une disposition préférée de ce mode de mise en oeuvre, le lactosérum est chauffé après la fermentation et préalablement à la centrifugation, à une température comprise entre 80 et 95°C pendant 15 à 30 minutes, de préférence à 85°C pendant 30 minutes.

Selon encore une autre disposition préférée de ce mode de mise en oeuvre, le procédé comprend en outre une étape au cours de laquelle on procède à l'ultrafiltration du surnageant de centrifugation sur une membrane, organique ou minérale, possédant un seuil de coupure compris entre 50 000 et 300 000 daltons, de préférence de 100 000 daltons, et l'on recueille le filtrat obtenu.

La présente Invention a également pour objet des préparations fermentées à base de lactosérum, susceptibles d'être obtenues par un procédé conforme à l'Invention, tel que défini ci-dessus.

Ces préparations possèdent un effet particulièrement bénéfique sur l'état et l'aspect du tissu cutané, et peuvent donc en particulier constituer le principe actif de base de compositions cosmétiques buvables, ou destinées à un usage externe, qui font également partie de l'objet de la présente Invention.

De manière inattendue, les préparations fermentées à base de lactosérum possèdent également un effet immunostimulant.

Pour l'obtention de ces compositions, et en particulier des compositions cosmétiques, les préparations fermentées conformes à l'Invention peuvent être diluées par addition d'eau, et/ou additionnées de substances diverses, en particulier d'autres principes actifs tels que oligoéléments, vitamines, extraits d'algue ou des véhicules adaptés à la formulation.

Tout particulièrement, les Inventeurs ont constaté que lorsqu'une préparation fermentée conforme à l'Invention était combinée à au moins un principe actif

choisi dans le groupe constitué par les vitamines A, E, C, B1, le sélénium, le β -carotène et la superoxyde dismutase (SOD), les effets favorables sur la peau étaient très notablement augmentés, aussi bien lors d'une
5 administration systémique que lors de l'usage externe et l'effet antiradicalaire était significativement supérieur à celui obtenu avec les antiradicalaires tels que les vitamines C et E ou le sélénium utilisés seuls.

Des compositions conformes à l'Invention ont
10 en particulier une action sur le taux de sébum, et sur l'hydratation et la fermeté de la peau, qui lui confère un aspect plus doux et plus lisse.

Les vitamines sont ajoutées de préférence en une quantité calculée pour qu'une prise journalière d'une
15 composition conforme à l'Invention assure entre 20 et 40% des apports nutritionnels quotidiens recommandés pour chacune des vitamines considérées.

De préférence, le β -carotène est ajouté à un taux compris entre 10 et 30 mg pour 100 g de composition
20 prête à l'emploi, le sélénium est ajouté à un taux compris entre 10 et 40 μ g pour 100 g de composition prête à l'emploi, et la superoxyde dismutase est ajoutée à un taux compris entre 2000 et 10000 unités internationales pour 100 g de composition prête à l'emploi.

25 Les principes actifs hydrosolubles peuvent être dissous directement dans le lactosérum.

Les principes actifs liposolubles peuvent être ajoutés sous forme hydrodispersible ; avantageusement il sont incorporés sous forme de microparticules telles que
30 celles obtenues par exemple par le procédé décrit dans la Demande EP 501 094, déposée au nom de WORLD TRUST INVESTMENT S.A..

Les compositions buvables conformes à l'Invention peuvent être aromatisées par addition
35 d'arômes alimentaires, et/ou sucrées, avant d'être conditionnées dans des contenants du volume souhaité.

Les compositions buvables conformes à l'Invention sont administrées de préférence à une dose correspondant à l'absorption d'une quantité comprise entre 30 et 100 ml par jour d'une composition contenant 5 40% en volume d'une préparation fermentée conforme à l'Invention.

Les compositions à usage externe conformes à l'invention comprennent de préférence 10 % en volume d'une préparation fermentée conforme à l'invention.

10 La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples d'obtention de compositions conformes à l'Invention, et montrant leur activité sur la peau.

15 Il va de soi toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Préparation du lactosérum multifermementé.

20 On utilise du lactosérum en poudre reconstitué avec de l'eau à raison de 60 grammes de lactosérum pour 1 litre d'eau.

Le lactosérum est additionné de 1,5 pour cent d'extrait de levure afin de permettre une meilleure 25 croissance des bactéries.

Le lactosérum enrichi est stérilisé, refroidi à 28°C et ensemencé avec le mélange de bactéries et levures suivant :

30 *Lactobacillus hilgardii,*
Lactobacillus casei,
Lactobacillus cellobiosus,
Lactobacillus brevis,
Lactobacillus acidophilus,
Lactobacillus kefir,
35 *Lactobacillus delbrueckii,*
Streptocoque lactis,

5 *Streptocoque cremoris*,
 Streptocoque diacetylactis,
 Leuconostoc mesenteroides,
 Leuconostoc kefir,
 Saccharomyces delbrueckii,
 Saccharomyces cerevisiae,
 Kluyveromyces fragilis,
 Kluyveromyces bulgaricus,
 Saccharomyces unisporus,
10 *Torula holmii*,
 Saccharomyces globosus
 Saccharomyces carlbergensis,
 Kluyveromyces lactis,
 Candida tenuis,
15 *Candida kefir*.

L'ensemencement est réalisé à l'aide de pré-cultures de 16 heures de chacune des souches de bactéries et de levures dans du milieu M 17 lactosé (milieu de marque DIFCO).

20 Le lactosérum ensemencé est maintenu à 28°C pendant 24 heures avec une agitation permanente à l'aide d'un mélangeur équipé d'une pale large en rotation lente (70 tours par minute).

25 Pendant les 18 premières heures, le lactosérum est maintenu à un pH de 5,5 par adjonction de soude concentrée à l'aide d'une pompe doseuse.

Pendant les 6 dernières heures, la régulation de pH est arrêtée.

30 Le produit ainsi obtenu est ultra-filtré tangentielllement sur membrane organique spirale en PVDF (MILLIPORE), de seuil de coupure 100 000 D.

L'appareil est réglé de telle façon que l'on ait une pression transmembranaire de 0,5 bar.

35 En variante, avant de procéder à l'ultrafiltration, et après 24 heures de fermentation, le

lactosérum multi-fermenté est porté à une température de 85°C et maintenu à cette température pendant 30 minutes.

Les phospholipides du sérum qui ont précipité lors de l'étape précédente sont séparés par centrifugation continue (à 4500 g), puis l'on procède à l'ultrafiltration sur le surnageant ainsi obtenu.

EXEMPLE 2 : Préparation d'une composition cosmétique buvable conforme à l'invention : Composition I.

L'ultra-filtrat obtenu à l'exemple 1 est dilué avec de l'eau potable de façon à obtenir une solution contenant 40 % de lactosérum clarifié et filtré. Cette solution est additionnée de (pour 100 g) :

- 100 UI de vitamine A
- 0,2 mg de vitamine B1
- 30 mg de vitamine C
- 2 UI de vitamine E

En variante, 25 microgrammes de sélénium (levure sélénée), peuvent, en outre, être ajoutés.

Ces vitamines et éventuellement le sélénium possèdent des effets bénéfiques pour la peau.

Les vitamines C et E et le sélénium possèdent des propriétés anti-radicaux libres.

Les vitamines A et B1 possèdent un effet bénéfique sur la régénération des membranes des cellules.

Le lactosérum dilué et vitaminé est aromatisé et sucré pour des raisons organoleptiques :

On ajoute au produit (pour 100 g) :

- . 2,80 g de saccharose
- . 0,40 g d'arôme naturel de vanille
- . 0,05 g d'arôme naturel d'abricot.

On obtient ainsi une composition I qui, pour une meilleure conservation, peut notamment être pasteurisée.

EXEMPLE 3 : Préparation d'une composition cosmétique buvable conforme à l'invention : Composition II.

Au produit obtenu dans l'exemple 2, sont ajoutés :

- 5 . 15 mg de bêta carotène qui possède des propriétés photo-protectrices.

EXEMPLE 4 : Préparation d'une composition cosmétique buvable conforme à l'invention : Composition III.

10 Au produit obtenu dans l'exemple 2, sont ajoutés :

. 5000 UI de S.O.D. (super oxyde dismutase) qui possède des effets anti-radicaux libres ainsi que des propriétés régénératrices du tissu cutané.

EXEMPLE 5 : Préparation d'une composition cosmétique buvable conforme à l'invention : Composition IV.

15 L'ultra-filtrat obtenu à l'exemple 1 est dilué avec de l'eau potable de façon à obtenir une solution contenant 40 % de lactosérum clarifié et filtré. Cette solution est additionnée de (pour 100 g) :

- 20 - 30 mg de zinc,
- 30 mg de vitamine C.

Le lactosérum dilué et vitaminé est aromatisé et sucré pour des raisons organoleptiques, comme précisé à l'exemple 2.

25 **EXEMPLE 6** : Effets sur le tissu cutané de la composition I selon l'exemple 2 : action sur le taux de sébum (indice lipidique mesuré par sébumétrie).

Les essais ont été effectués en double aveugle contre placebo.

30 La composition I obtenue comme décrit dans l'exemple 2, est administrée oralement à un groupe de 10 sujets, pendant 28 jours (1 flacon de 45 ml/j).

En parallèle, un groupe de 25 sujets a reçu des compositions (produit de référence) obtenues par fermentation du lactosérum avec le mélange de microorganismes suivant :

35

5 *Lactobacillus acidophilus*,
 Lactobacillus casei,
 Lactobacillus caucasicus,
 Lactobacillus buchnieri,
 Lactobacillus cellobiosus,
 Lactobacillus kefir,
 Lactobacillus brevis,
 Streptococcus lactis,
10 *Saccharomyces cerevisiae*,
 Saccharomyces delbrueckii,
 Saccharomyces exiguus,
 Saccharomyces unisporus,
 Saccharomyces uvarum,
 Saccharomyces carlbergensis,
15 *Candida tenuis*,
 Candida kefir,
 Candida pseudotropicalis,
 Kluyveromyces fragilis.

20 Un troisième groupe témoin (25 sujets) a reçu
un placebo constitué par de l'eau distillée, aromatisée
et sucrée.

Les résultats sont indiqués dans le Tableau I
ci-dessous et à la figure 1.

25 Les effets ont été évalués en déterminant
l'indice de sébumétrie (qui est proportionnel au taux
lipidique de la surface de l'épiderme), au 14ème jour
(Tableau I), au 28ème jour et 12 jours après l'arrêt du
traitement (40ème jour) (figure 1).

30 Le taux de stimulation de l'indice lipidique
obtenu avec la composition I représente plus de 25 % de
l'indice lipidique initial (placebo) (figure 1). En
outre, ce taux de stimulation est également
significativement supérieur à celui obtenu avec du lacto-
sérum multifermenté seul (produit de référence, Tableau
35 I), pour lequel on observe un taux de stimulation de
8,5 %.

TABLEAU I

Placébo		Produit de référence		Produit selon l'invention	
	J-1	J-14	J-1	J-14	J-14
1	95	103	1	25	1
2	92	87	2	98	2
3	47	27	3	61	3
4	45	64	4	77	4
5	97	73	5	113	5
6	66	137	6	85	6
7	105	57	7	77	7
8	142	109	8	136	8
9	80	147	9	64	9
10	79	72	10	140	10
moienne	84,8	87,6		87,6	90,6
					111,8

5

10

15

20

25

30

35

EXEMPLE 7 : Effets sur le tissu cutané de la composition I selon l'exemple 2 : action sur l'hydratation de la peau.

Les essais ont été effectués en double aveugle
5 contre placebo.

Des compositions conformes à l'invention (Composition I), obtenues comme décrit dans l'exemple 2, sont administrées oralement à un groupe de 5 sujets (groupe 4).

10 En parallèle :

- un groupe de 5 sujets (groupe 1) a reçu un placebo constitué par de l'eau distillée, aromatisée et sucrée ;

15 - un groupe de 5 sujets (groupe 2) a reçu la Composition I pendant 17 jours, puis un placebo pendant 8 jours ;

- un groupe de 5 sujet (groupe 3) a reçu un placebo pendant 17 jours, puis la Composition I pendant 8 jours.

20 Les résultats sont illustrés au Tableau II suivant et à la figure 2 et montrent un taux de stimulation d'hydratation de 41,90 %, significativement plus élevé que la stimulation obtenue avec le placebo, qui est de -0,1 % :

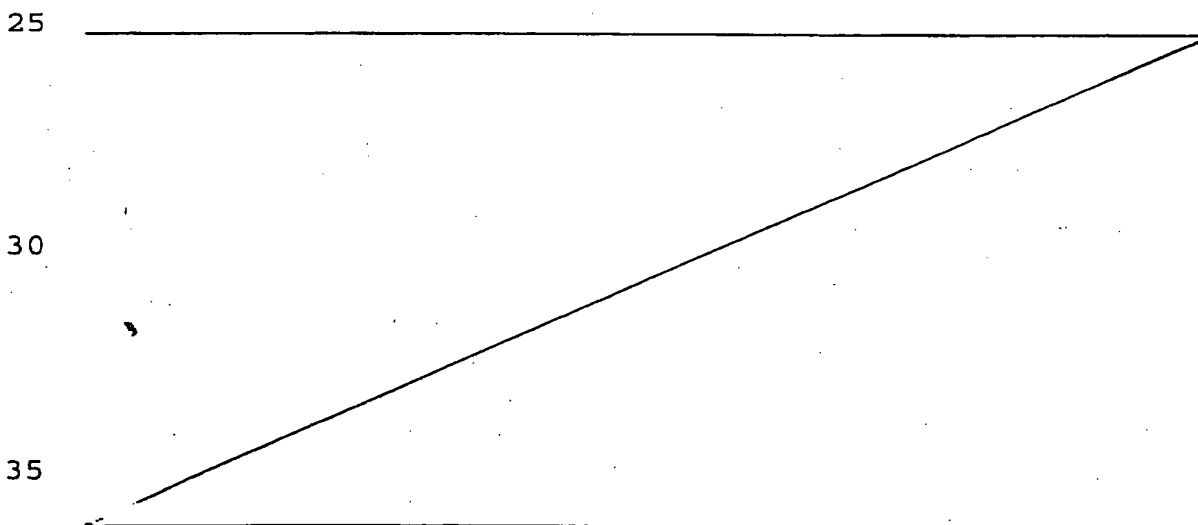


TABLEAU II

	J0	J10	J11	J12	J13	J14	J17	J25
G	73,50	63,35	70,48	65,75	75,05	68,45	69,20	66,20
R	78,50	60,50	73,55	65,75	70,60	62,75	71,90	67,80
O	80,30	74,48	91,37	85,77	94,60	94,60	96,30	93,08
U	80,40	79,70	93,40	90,80	101,90	97,45	95,60	95,77
P	92,64	86,95	91,95	94,85	89,30	89,70	90,40	92,51
E	105,55	94,10	99,00	98,42	102,15	101,85	96,35	101,10
1								
G	78,30	67,90	68,80	72,08	74,60	71,30	79,60	68,50
R	78,55	69,85	68,90	71,88	74,55	67,80	76,75	65,19
O	84,64	81,45	92,75	94,80	94,90	97,65	101,40	84,29
U	85,70	85,83	86,25	92,53	92,10	98,05	100,25	86,81
P	85,65	86,21	85,12	91,95	92,25	99,00	101,00	87,20
E	98,70	95,00	99,75	105,48	98,30	100,35	105,15	98,50
2								

5

10

15

20

25

30

35

TABLEAU II (suite)

	J0	J10	J11	J12	J13	J14	J17	J25
G	73,00	77,80	81,70	79,40	78,20	73,10	78,70	100,94
R	75,68	75,85	77,15	79,05	75,45	72,60	76,70	102,53
O	91,05	92,70	92,75	94,00	92,80	87,11	93,30	123,69
U	85,83	90,42	94,15	92,80	88,10	88,25	89,60	126,31
P	85,85	81,02	88,50	89,55	82,85	77,14	86,20	119,99
E	94,18	95,75	96,00	101,40	95,25	92,55	99,55	121,19
3								
G	71,43	79,00	74,90	73,15	69,50	66,31	75,65	63,95
R	71,95	80,35	71,20	70,70	72,65	66,90	73,70	101,31
O	85,28	91,85	95,55	99,25	95,40	84,97	84,78	121,35
U	80,75	94,25	95,50	98,15	90,70	89,70	86,18	122,50
P	85,38	94,50	96,45	88,47	83,40	87,13	92,55	121,15
E	95,52	103,80	105,60	106,85	99,20	95,82	105,50	129,00
4								

EXEMPLE 8 : Effet antiradicalaire de la composition I selon l'exemple 2.

A partir d'un prélèvement de sang humain, on isole les globules rouges. Après centrifugation et lavage, on prépare une solution d'hématies à 22 %.

Les différents lots à tester sont préparés comme suit :

- Lot témoin :

1 ml d'hématies à 22 % + 500 µl de 2,2'-azobis(2-amidinopropane) chlorhydrate (générateur de radicaux libres) + 500 µl de NaCl.

- Lots composition I (pur et à différentes dilutions) :

1 ml d'hématies à 22 % + 500 µl de 2,2'-azobis(2-amidinopropane) chlorhydrate + 500 µl de composition I.

3 lots ont été réalisés avec 500 µl de différentes dilutions de composition I (respectivement 1 - 1/10 - 1/100).

Les différents mélanges sont placés à une température de 37°C. Il y a à cette température une libération de radicaux libres hydroperoxy $\text{ROO}\cdot$ par le générateur. Les radicaux libres attaquent les membranes de globules rouges qui sont détruites. A ce moment là, l'hémoglobine est libérée dans le milieu extérieur qui se colore. On évalue l'hémolyse grâce à l'absorbance relative à la coloration. Le dosage colorimétrique est réalisé à 405 nm.

Dans le lot témoin, l'hémolyse se produit à partir de la 50ème minute (figure 3, courbe (1)).

Dans le lot Composition I non diluée (figure 3, courbe (2)), l'hémolyse se produit à partir de la 260ème minute. Les cellules sont donc protégées 5 fois plus longtemps.

On observe un effet protecteur de la composition dose-dépendant :

- 100 minutes de protection obtenues avec la composition diluée au 1/10ème (figure 3, courbe (3)),

- 50 minutes de protection obtenues avec la composition diluée au 1/100ème (figure 3, courbe (4)).

5 **EXEMPLE 9 : Effet antiradicalaire et immunopharmacologique des différentes compositions selon l'invention.**

A. Effet inhibiteur sur la production d'espèces réactives de l'oxygène de la composition I selon l'exemple 2 :

10 L'effet de la Composition I sur la production d'espèces réactives de l'oxygène est mesurée par le test de chimiluminescence sur la lignée murine J 744 (astrocytome), après activation des cellules par un phorbol-ester (PMA) ou par le zymosan (Zym) non opsonisé.
 15 L'effet de la Composition I a été évalué sur les cellules J 744 soit directement, soit après un prétraitement de 24 heures à 37°C, en présence ou en l'absence d'interféron-γ (IFN-γ) (10 U/ml) et/ou de lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/ml).

20 La chimiluminescence est mesurée dans un lumimètre LKB 1251.

Les résultats sont illustrés ci-après aux Tableaux III à VII :

25 **1) Effet de la Composition I (Compo I) par action directe, sur la chimiluminescence des cellules J 744 :**

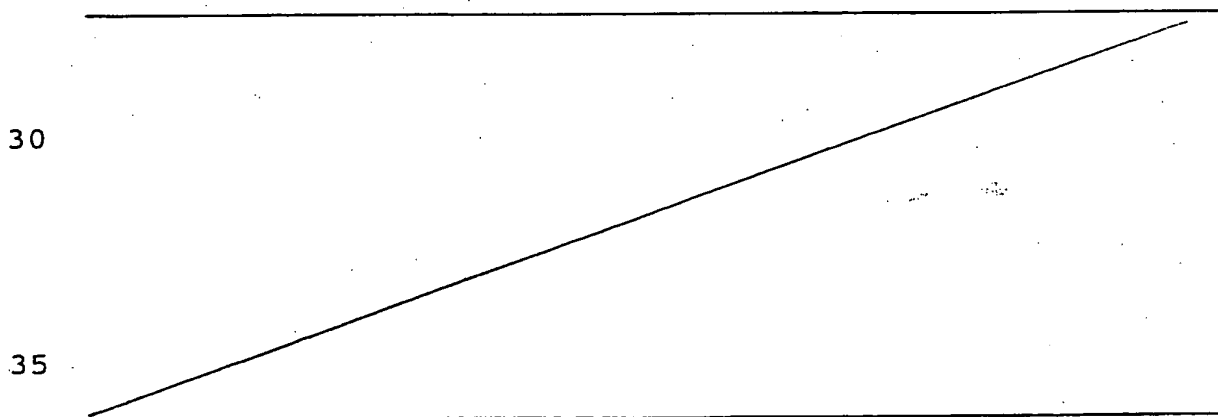


TABLEAU III

	1 ^a	2	3	4	5	mtsem	p
Témoin							
PMA	8470 ^b	49400	82900	107000	100000		
Zymosan	34600	26200	nd ^c	nd	nd		
Compo I 1/20							
PMA	-74,97 ^d	-73,68	-79,25	-85,89	-88,6	-80,5±2,9	0,5 %
Zymosan	-66,18	-74,01	nd	nd	nd	-70,1±4	
Compo I 1/40							
PMA	-45,93	-38,87	-46,80	-64,21	-61,10	-51,4±4,8	0,5 %
Zymosan	-50,87	-58,78	nd	nd	nd	-54,8±4	
Compo I 1/100							
PMA	nd	-20,24	-17,73	-36,36	-30,40	-26,2±4,4	1 %
Zymosan	-36,13	-47,71	nd	nd	nd	-41,9±5,8	

a, nombre d'expériences indépendantes

b, valeur de l'aire sur la courbe (intégrale)

c, non déterminé

d, pourcentage de changement dans la production d'espèces réactives de l'O₂

2) Effet d'un prétraitement de 24 heures par la Composition I sur la chimiluminescence des cellules J 774 :

TABLEAU IV

	1 ^a	2	3	4	5	mise	p
Témoin							
PMA	12700 ^b	4970	9900	6600	6110		
Zymosan	19300	14300	9600	10000	nd ^c		
Compo I 1/20							
PMA	-24,41 ^d	-61,77	-43,64	-60,45	-56,96	-49,4±7	0,5 %
Zymosan	-71,61	-31,05	-47,08	-52,3	nd	-50,5±8,4	1 %
Compo I 1/40							
PMA	-21,57	-53,72	-41,52	-33,33	-29,62	-36,0±5,5	0,5 %
Zymosan	-63,26	-9,10	-39,79	-41,90	nd	-38,5±11,1	1 %
Compo I 1/100							
PMA	-28,82	-43,46	-32,53	-13,79	nd	-29,7±6,1	1 %
Zymosan	-62,54	-14,69	-41,77	-40,6	nd	-32,6±16,5	1 %

a, nombre d'expériences indépendantes

b, valeur de l'aire sur la courbe (intégrale)

c, non déterminé

d, pourcentage de changement dans la production d'espèces réactives de l'O₂

3) Effet d'un prétraitement de 24 heures par la Composition I sur la chimiluminescence des cellules J 744 activées par le lipopolysaccharide (100 ng/ml) :

TABLEAU V

	1a	2	3	4	mise	p
Témoin						
PMA	6430 ^b	5230	3810	2260		
Zymosan	9170	5690	40800	11500		
Compo I 1/20						
PMA	-47,28 ^c	-59,08	-53,54	nd	-53,3±3,4	1,7 %
Zymosan	-30,86	-11,78	-62,99	nd	-14,6±27,1	2,5 %
Compo I 1/40						
PMA	-23,48	-8,03	-40,42	-42,92	-28,7±8,1	1 %
Zymosan	-26,72	-0,35	-52,70	1,74	-19,6±12,8	1 %
Compo I 1/100						
PMA	-5,75	-15,30	-44,62	-7,52	-18,3±9	1 %
Zymosan	-18,76	-11,07	-54,41	-68,70	-3,4±26	1 %

a, nombre d'expériences indépendantes

b, valeur de l'aire sur la courbe (intégrale)

c, pourcentage de changement dans la production d'espèces réactives de l'O₂

d, non déterminé

4) Effet d'un prétraitement de 24 heures par la Composition I sur la chimiluminescence des cellules J 744 activées par l'interféron- γ (10 U/ml) :

TABLEAU VI

	1 ^a	2	3	4	5	ntsem	p
Témoin							
PMA	60400 ^b	36800	107000	36400	45700		
Zymosan	123000	366000	183000	183000	nd ^c		
Compo I 1/20							
PMA	-36,26 ^d	43,48	-33,18	-43,41	-14,22	-16,7 \pm 15,8	0,5 %
Zymosan	30,89	-34,15	-42,62	-21,86	nd	-16,9 \pm 16,5	0,1 %
Compo I 1/40							
PMA	-56,29	14,13	-19,16	-26,10	-4,38	-18,4 \pm 11,7	0,5 %
Zymosan	15,45	-33,06	-31,15	14,21	nd	-8,6 \pm 13,6	0,1 %
Compo I 1/100							
PMA	-55,30	-3,53	-16,64	-34,34	14,66	-19 \pm 12,1	0,5 %
Zymosan	-0,81	-34,70	-44,26	-26,23	nd	-26,5 \pm 9,3	1 %

a, nombre d'expériences indépendantes

b, valeur de l'aire sur la courbe (intégrale)

c, non déterminé

d, pourcentage de changement dans la production d'espèces réactives de l'O₂

5) Effet d'un prétraitement de 24 heures par la Composition I sur la chimiluminescence des cellules J 744 activées par l'interféron- γ (10 U/ml) et le lipo-polysaccharide (100 ng/ml) :

TABLEAU VII

	1 ^a	2	3	4	5	ntsem	p
Témoin							
PMA	53300 ^b	70100	294000	72200	201000		
Zymosan	454000	988000	448000	nd ^c	nd		
Compo I 1/20							
PMA	-84,69 ^d	-46,22	-53,40	-44,32	-42,29	-54,2 \pm 7,9	0,7 %
Zymosan	-50,66	-39,37	-18,75	nd	nd	-23,8 \pm 21,5	2,5 %
Compo I 1/40							
PMA	-67,54	-28,25	-58,16	23,96	-45,77	-35,2 \pm 16,2	0,7 %
Zymosan	-38,55	-32,09	13,39	nd	nd	-19,1 \pm 16,3	2,5 %
Compo I 1/100							
PMA	-65,10	nd	-22,79	3,32	-54,83	34,9 \pm 15,6	1 %
Zymosan	nd	-34,72	-1,12	nd	nd	-17,9 \pm 16,8	

a, nombre d'expériences indépendantes

b, valeur de l'aire sur la courbe (intégrale)

c, non déterminé

d, pourcentage de changement dans la production d'espèces réactives de l'O₂

Ces essais montrent un effet inhibiteur puissant de la Composition I sur la production d'espèces réactives de l'oxygène ; cet effet est observé aussi bien par action directe qu'après prétraitement des cellules pendant 24 heures. L'inhibition est dose-dépendante selon les activateurs et est encore significative à la dilution au 1/100.

B. Effet inhibiteur sur la production d'espèces réactives de l'azote :

10 L'effet de la Composition I sur la production d'espèces réactives de l'azote est mesurée par une méthode colorimétrique, en utilisant le réactif de Griess, sur la lignée murine J 744 (astrocytome).

15 Les cellules sont activées en présence d'interféron- γ seul (10 U/ml) (IFN- γ) ou associé au lipopolysaccharide (100 ng/ml) (LPS) ; les oxydes nitriques sont dosés dans le surnageant après 24 ou 48 heures de culture à 37°C. La Composition I est ajoutée aux cultures en même temps que l'interféron- γ et/ou le
20 lipopolysaccharide.

1) Effet de la Composition I sur la production des NO par les cellules J 744 activées par l'interféron- γ seul (10 U/ml) ou l'interféron- γ (IFN) et le lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/ml), au bout de 24 heures de cul-
25 ture :

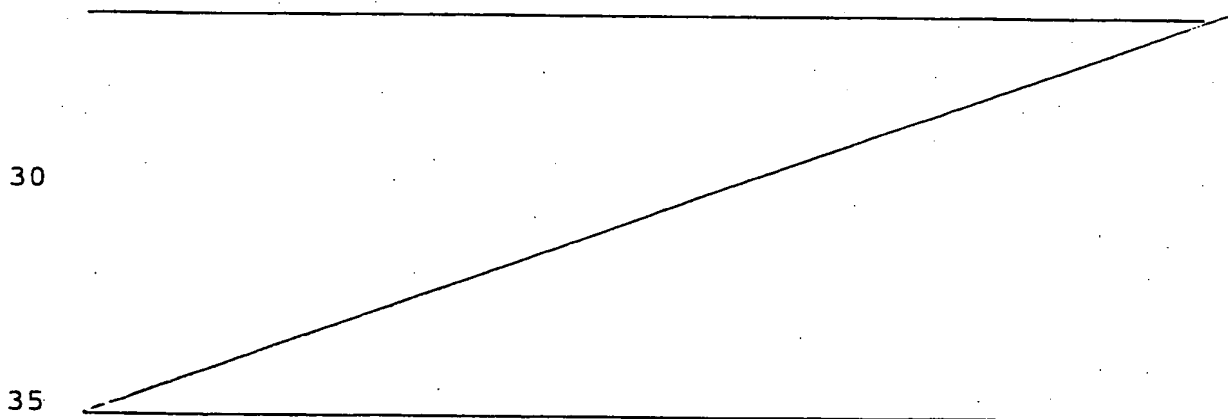


TABLEAU VIII

Témoin	1a	2	3	msem	p
IFN	6,70 ^b	10,32	4,34		
IFN + LPS	18,72	22,28	11,47		
Compo I 1/20					
IFN	-10,75 ^c	-16,23	-9,91	-12,3±2	2,5 %
IFN + LPS	-23,18	-37,21	-24,5	-28,3±4,5	2,5 %
Compo I 1/40					
IFN	-17,91	-20,54	-3,69	-14±5,2	2,5 %
IFN + LPS	-28,69	-30,05	-28,68	-29,1±0,5	2,5 %
Compo I 1/100					
IFN	-20,0	-27,71	-11,98	-19,9±4,5	2,5 %
IFN + LPS	-25,05	-30,70	-22,32	-26,0±2,5	2,5 %

a, nombre d'expériences indépendantes

b, concentration en nitrites dans le surnageant de culture en nmoles/ml

c, pourcentage de changement dans la production des NO

2) Effet de la Composition I sur la production
des NO par les cellules J 744 activées par l'interféron- γ
seul (10 U/ml) ou l'interféron- γ (IFN) et le
lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/ml), au bout de
 5 48 heures de culture :

TABLEAU IX

	1 ^a	2	3	mise	p
Témoin					
IFN	23,53 ^b	34,23	26,28		
IFN + LPS	58,32	69,92	52,26		
Compo I 1/20					
IFN	-21,80 ^c	-15,32	-1,10	-12,7 \pm 6,1	2,5 %
IFN + LPS	-44,70	-30,01	-19,66	-31,5 \pm 7,3	2,5 %
Compo I 1/40					
IFN	-19,51	-15,83	-1,41	-12,3 \pm 5,5	2,5 %
IFN + LPS	-37,26	-24,61	-20,98	-27,6 \pm 4,9	2,5 %
Compo I 1/100					
IFN	-17,59	-13,92	-8,41	-13,3 \pm 2,7	2,5 %
IFN + LPS	-26,83	-21,12	-22,22	-23,4 \pm 1,7	2,5 %

a, nombre d'expériences indépendantes

b, concentration en nitrates dans le surnageant de culture en nmoles/ml

c, pourcentage de changement dans la production des NO

Ces expériences (Tableaux VIII et IX) montrent un effet inhibiteur de la composition I sur la production des NO par les cellules J 744 activées (IFN- γ et/ou LPS).

5 C. Effet immunostimulant du lactosérum fermenté conforme à l'invention et comparaison avec la composition I :

1) Lactosérum :

L 1/20	53,5 % de stimulation	(1) ^b
L 1/40	264,1 % de stimulation	(1)
L 1/100	218,0 % de stimulation	(1)

b : nombre d'expériences indépendantes.

2) Eau + substances de la composition I autres que le lactosérum multiférmementé (E) :

E 1/20	98,0 % d'inhibition	(1) ^b
E 1/40	95,2 % d'inhibition	(1)
E 1/100	88,2 % d'inhibition	(1)

b : nombre d'expériences indépendantes.

L'ensemble des essais ci-dessus montrent :

20 1. une amplification de stimulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par le lactosérum multiférmementé seul.

25 Cette amplification de stimulation s'explique par une activation de la PKC (protéine kinase C) et correspond à une action immunostimulante sur les cellules.

2. un effet inhibiteur très important des vitamines sur la production d'espèces réactives de l'oxygène.

30 3. les essais réalisés avec la composition I montrent que, de manière inattendue, les effets opposés du lactosérum multiférmementé et des vitamines sur l'immunostimulation ne s'annulent pas, mais que la composition I présente à la fois une action antiradicalaire et une action immunostimulante.

EXEMPLE 10 : Préparation de compositions cosmétiques à usage externe.

On prépare le lactosérum multiférménté comme précisé à l'exemple 1 a).

5 L'ultrat-filtrat obtenu est dilué avec de l'eau déminéralisée, de façon à obtenir une solution contenant 10 % de lactosérum clarifié et filtré.

Cette solution est associée à des excipients convenables et éventuellement à d'autres substances
10 actives, conformément aux formulations ci-après :

*** Emulsion régénératrice :**

	Lactosérum multiférménté	10,00
	Propylène glycol	5,00
	Carbopol	0,60
15	Alcool cétylique	1,00
	Lanoline	10,00
	Huiles végétales	7,00
	Myristate d'isopropyle	10,00
	Triéthanolamine	0,60
20	Alpha tocophérol	0,05
	Conservateurs	0,15
	Parfum	0,20
	Eau déminéralisée	qsp 100

*** Lotion tonique pour le corps :**

25	Lactosérum multiférménté	10,00
	Extrait hydroglycolique de	
	Centella asiatica	10,00
	Glycérine	5,00
	EDTA	0,05
30	Acide lactique	0,50
	Lactate de sodium (sol. à 70 %)	0,50
	Urée	0,25
	Pyrrolidone carboxylate de sodium	
	(sol. à 50 %)	0,75
35	Conservateurs	0,25
	Parfum	0,20

	Eau déminéralisée	qsp 100
	* Masque stimulant :	
	Lactosérum multiférménté	10,00
	Kaolin	5,00
5	Lait en poudre	2,00
	Talc	12,00
	Stéaralkonium bentonite	8,00
	Glycérine	10,00
	Propylène glycol	10,00
10	Alcool polyvinyle	0,50
	Diocetyl succinate de sodium	0,50
	Conservateurs	0,15
	Parfum	0,35
	Eau déminéralisée	qsp 100
15	* Fond de teint traitant :	
	Lactosérum multiférménté	10,00
	Cérésine	5,00
	Cire de carnauba	5,00
	Ozokérite®	3,00
20	Alcool de lanoline	21,00
	PPG 45 dodécyl glycol copolymère	20,00
	Lactate de myristyle	20,00
	Complexe cire d'abeille-PEG-sorbitol	5,00
	Huiles végétales	4,00
25	Bentone	0,50
	Glycérine	5,00
	Conservateurs	0,30
	Eau déminéralisée	qsp 100
	* Lotion après-rasage :	
30	Lactosérum multiférménté	10,00
	Acide lactique	0,2-0,5
	Lactate de sodium	0,2-0,4
	Glycérine	2,00
	Allantoïne	0,15-0,35
35	EDTA (sel disodique)	0,05
	Carboxyméthyl cellulose	0,10

Conservateurs	0,25
Parfum	0,25
Eau déminéralisée	qsp 100

*** Lotion tonique pour les cheveux :**

5	Lactosérum multiférenté	10,00
	Cyclométhicone	30,00
	Isononaoate d'octyle	4,00
	Alcool cétylique éthoxyle 20 propoxyle 5	2,00
10	Extrait de lotus	0,50
	Extrait d'orchidées	0,75
	Parfum	0,15
	Alcool éthylique 96 %	qsp 100

Ainsi que cela ressort de ce qui précède,
15 l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de
mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui vien-
nent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en
embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent
venir à l'esprit du technicien en la matière, sans
20 s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente inven-
tion.

REVENDEICATIONS

1) Procédé d'obtention d'une préparation à base de lactosérum, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on procède
5 à la fermentation de lactosérum par un mélange de microorganismes comprenant au moins un lactobacille choisi dans le groupe constitué par *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*,
10 *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus delbrueckii* ; au moins un streptocoque choisi dans le groupe constitué par : *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, au moins un *Leuconostoc* choisi dans le groupe constitué par : *Leuconostoc mesenteroides*, et
15 *Leuconostoc kefir* ; au moins une levure choisie dans le groupe constitué par : *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *Saccharomyces unisporus*, *Torula holmii*, *Saccharomyces globosus*, *Saccharomyces carlbergensis*,
20 *Kluyveromyces lactis*, *Candida tenuis*, *Candida kefir*.

2') Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit mélange de microorganismes comprend au moins : *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Kluyveromyces lactis*.
25

3') Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la fermentation est effectuée à une température comprise entre 25 et 30°C, pendant une durée comprise entre 18 et 30 heures,
30 par exemple 24 heures.

4') Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape au cours de laquelle l'on procède à la centrifugation du lactosérum fermenté, à une force centrifuge comprise entre 4000 et 8000 g.
35

5') Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le lactosérum est chauffé après la fermentation et préalablement à la centrifugation, à une température comprise entre 80 et 95°C, pendant 15 à 30 minutes.

6') Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape au cours de laquelle on procède à l'ultrafiltration du surnageant de centrifugation sur une membrane, organique ou minérale, possédant un seuil de coupure compris entre 50 000 et 300 000 daltons, de préférence de 100 000 daltons, et l'on recueille le filtrat obtenu.

7') Préparation fermentée à base de lactosérum, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8') Composition cosmétique buvable, caractérisée en ce qu'elle comprend une préparation fermentée selon la revendication 7.

9') Composition cosmétique selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un principe actif choisi dans le groupe constitué par les vitamines A, E, C, B1, le sélénium, le β -carotène et la superoxyde dismutase (SOD).

10') Composition cosmétique à usage externe, caractérisée en ce qu'elle comprend une préparation fermentée selon la revendication 7.

11') Utilisation d'une préparation fermentée selon la revendication 7, ou d'une composition selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, pour améliorer l'aspect de la peau.

12') Utilisation d'une préparation fermentée selon la revendication 7, pour la préparation d'un médicament immunostimulant.

1/3

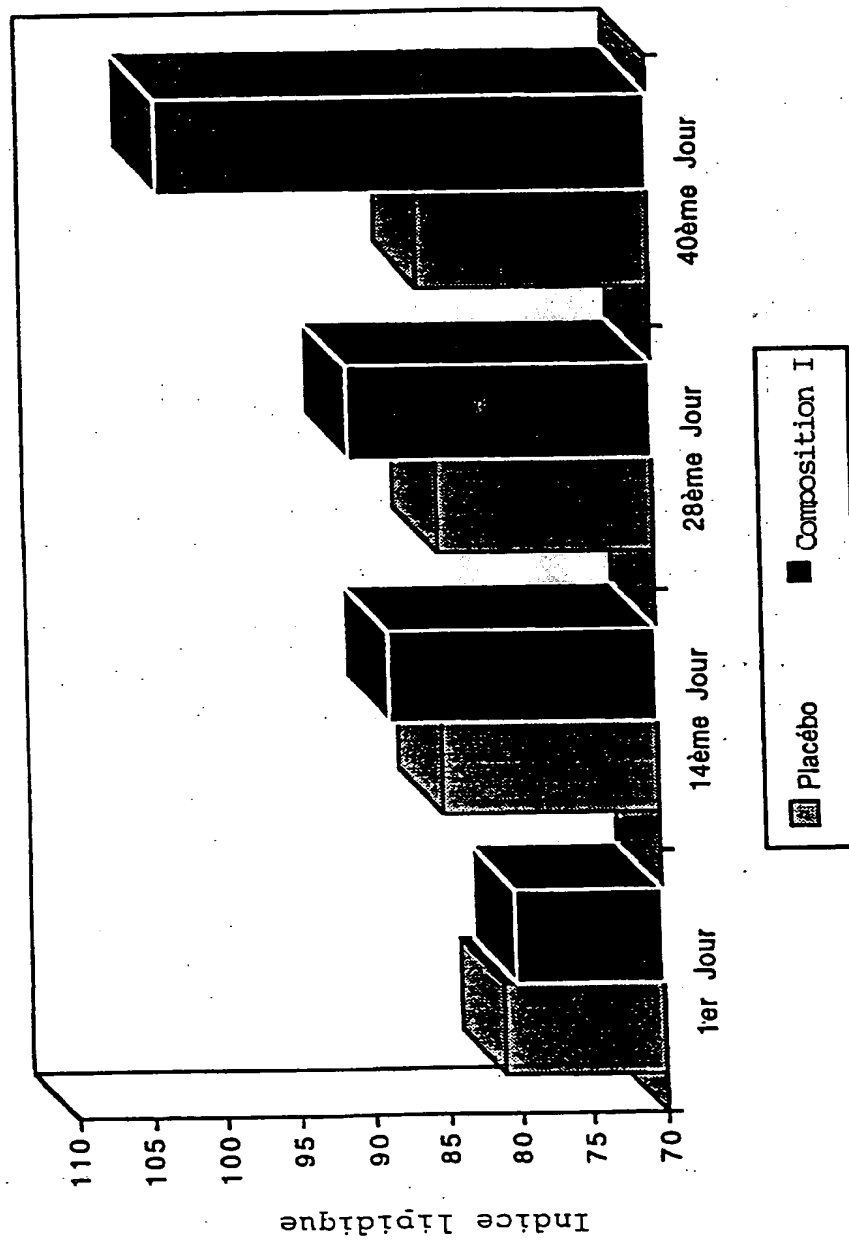


FIGURE 1

2/3

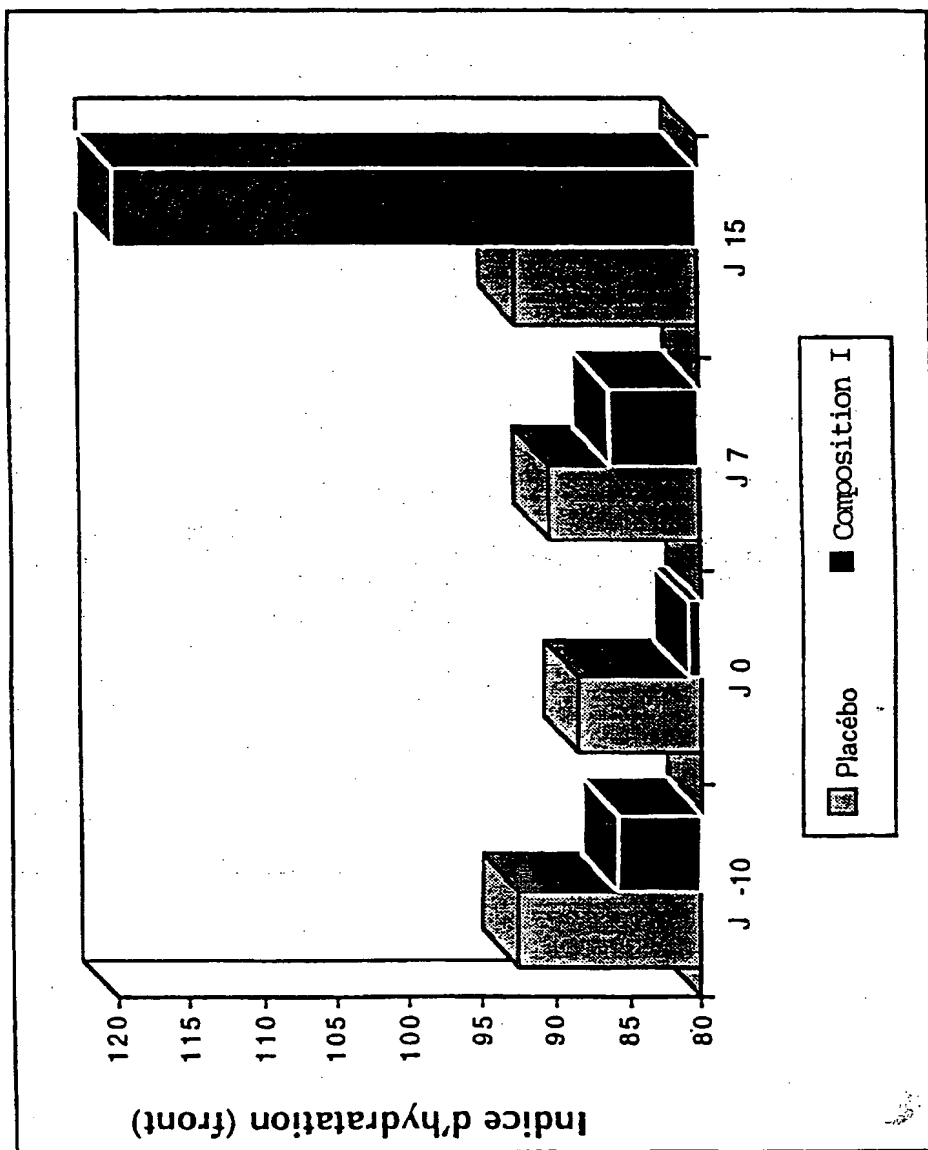


FIGURE 2

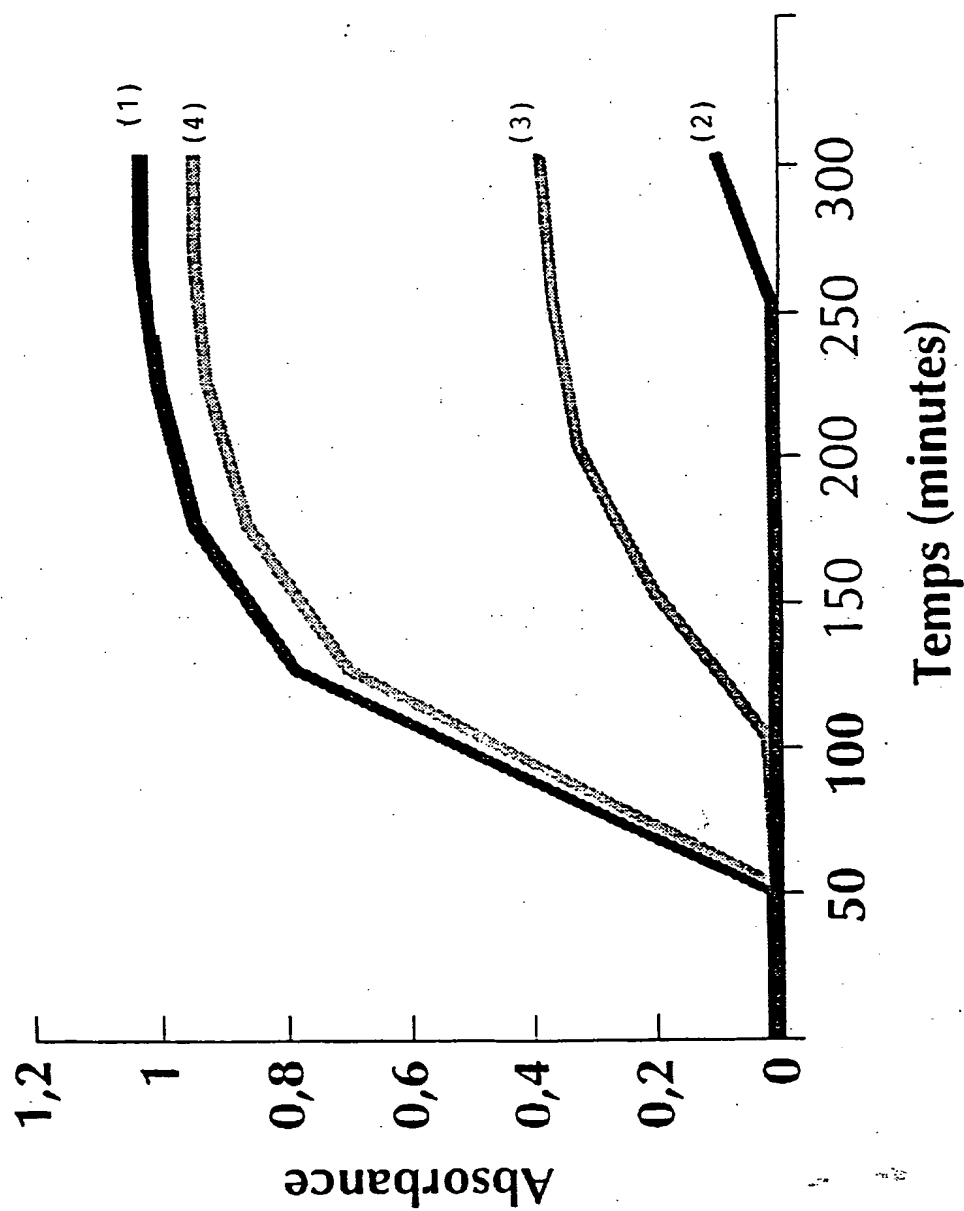


FIGURE 3

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 505663
FR 9409031

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	US-A-3 818 109 (R. BECHTLE) * colonne 5, ligne 39 - colonne 10, ligne 38; revendication 1; exemples 1-3 *	1,3,4,7
X	JOURNAL OF DAIRY SCIENCE., vol.54, no.11, 1971, CHAPAIN, ILLINOIS US pages 1595 - 1604 R. BECHTLE ET AL. 'Accelerated fermentation of cheese whey. Developing system' * page 1596, colonne 2 - page 1597, colonne 1 *	1,4,7
Y	DATABASE WPI Week 8234, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 82-71884E & SU-A-876 085 (DAIRY IND RES INST) 30 Octobre 1981 * abrégé *	1-3,7,8
Y	DEUTSCHE MOLKEREI-ZEITUNG - DMZ, vol.106, no.3, 1985, MUNCHEN DE pages 68 - 76 'Hefehaltige Sauermilchprodukte - Technologie und Stoffwechsel'	1-3,7,8
X	EP-A-0 469 200 (KYODO MILK INDUSTRY CO) * page 3, ligne 20 - page 4, ligne 35; revendications 1-9; exemples 1,3; tableau 1 *	1-3,5-8, 12
A	EP-A-0 357 162 (MEINHART H.) * revendications 1-6 *	10,11
A	DE-B-28 19 940 (H. ZIMZIK) * revendications 1-8 *	10,11
	--- -/-	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
12 Janvier 1995		Desmedt, G
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons * : membre de la même famille, document correspondant		

1
EPO FORM 150 (01/81) (P/C/C)

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2718752

N° d'enregistrement
national

INSTITUT NATIONAL

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 505663
FR 9409031

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	<p>DATABASE WPI Week 9340, 1992 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-318497 & SU-A-1 764 505 (KOLODKIN A.) * abrégé *</p> <p>-----</p>	12
		<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES 6)</p>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
12 Janvier 1995		Desmedt, G
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>----- & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 (1.1) (P0413)

THIS PAGE BLANK (USPTO)